



# 刺激隐核虫探针法荧光定量 PCR 试剂盒

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

官方 Q Q： 2881498548

官方网址：[www.tw-reagent.com](http://www.tw-reagent.com)

监督电话：021-54845833

## 产品及特点：

刺激隐核虫 (Cryptocaryon irritans) 又叫海水小瓜虫, 属原生动物门、纤毛亚门、寡膜纤毛纲、膜口亚纲、膜口目、凹口科、隐核虫属的一种。刺激隐核虫常寄生于海水硬骨鱼类的皮肤、鳃的上皮下, 可引起鱼类的传染性疾病。刺激隐核虫病是海水鱼养殖中危害最大的寄生虫性疾病, 又被渔民称为海水鱼白点病。目前, 刺激隐核虫病尚不属于国家规定的水生动物疫病和人鱼共患疾病, 但因其传染性较强, 可感染尖吻鲈、紫红笛鲷、东方鲀、大黄鱼、美国红鱼、鲈鱼、金鲳、石斑鱼、蓝子鱼、白胡椒鲷、真鲷、黑鲷、平鲷、红鳍笛鲷等各个品种的海水网箱养殖鱼类, 危害严重时甚至形成暴发性流行的水生动物疫病, 特别是鱼苗, 感染率和死亡率均可达 100%, 造成重大的经济损失, 因此刺激隐核虫的快速检测具有重要的意义。本产品就是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测刺激隐核虫的通用试剂盒。

1. 即开即用, 用户只需要提供样品 DNA 模板。
2. 引物和探针经过优化, 灵敏性高。
3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。
4. 特异性高, 引物是根据刺激隐核虫高度保守区设计, 不会跟其他病毒 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。

## 规格及成分：

编号	成分	规格
试剂一	2 $\times$ Probe qPCR MagicMix	500 $\mu$ L (本色盖)
试剂三	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL (黄盖)
试剂二	刺激隐核虫探针法 qPCR 引物混合液	100 $\mu$ L (白盖)
试剂四	刺激隐核虫探针法 qPCR 探针	50 $\mu$ L (棕色管)
试剂五	刺激隐核虫探针法 qPCR 阳性对照(1 $\times$ 10E8/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L (红盖)
	使用手册	1 份

## 运输及保存：

低温运输, -20 $^{\circ}$ C 保存, 保存期限为 12 个月。



## 自备试剂：

样品 DNA。

## 使用方法：

### 一、稀释标准曲线样品 (以 $10E2-10E7$ 拷贝/ $\mu$ L 这 6 个 10 倍稀释度为例)：

由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分)。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供无传染性的 DNA 片段作为阳性对照。

1. 标记 6 个离心管，分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。
2. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu$ L 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同)。
3. 在 7 号管中加入 5  $\mu$ L  $1 \times 10E8$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E7$  拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 6 号管中加入 5  $\mu$ L  $1 \times 10E7$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 5 号管中加入 5  $\mu$ L  $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E5$  拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。
6. 放冰上待用。重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

### 二、样品 DNA 的制备：

7. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是 PC (样品制备阳性对照)，一个是 NC (样品制备阴性对照)。可以用 10 $\mu$ L 阳性对照的 10000 倍稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容。

### 三、Probe qPCR 反应 (20 $\mu$ L 体系，在样品制备室进行)：

9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照 (用水做模板)，6 个用于标准曲线。如果做定性分析，并且只做 1 次重复，则标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照 (用水做模板)，1 个用于 PCR 阳性对照 (用第 4 号管的阳性对照稀释液做模板)。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
10. 在标记管中按下表加入各成分 (本表只列出一重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后最后加)：

成份	N+2 个样品管	PCR 阴性对照管	标准曲线样品管 (2-7 管)
2 $\times$ Probe qPCR MagicMix	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	各 10 $\mu$ L
刺激隐核虫探针法 qPCR 探针	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	各 1 $\mu$ L
刺激隐核虫探针法 qPCR 引物混合液	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	各 2 $\mu$ L
N+2 个待测 DNA 模板	7 $\mu$ L	--	--
超纯水	--	7 $\mu$ L	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)	--	--	各 7 $\mu$ L (2 号样到 2 号管, 3 号样



			到 3 号管)
--	--	--	---------

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：

过程	温度	时间
预变性	95℃	3 min
PCR 反应 40 个循环	95℃	15 sec
	60℃	1 min (采集 FAM 通道的荧光信号)

**四、数据处理：**

12. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。

13. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于或等于 30。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性，如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。若重复结果 Ct 值小于 40，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

**五、特别提示：**

本公司的所有产品，仅可用于科研实验，严禁用于临床医疗及其他非科研用途！